

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 136 074 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
26.09.2001 Bulletin 2001/39

(51) Int Cl.7: **A61K 35/78**, A61K 7/26,
A61P 1/00

(21) Numéro de dépôt: **01490011.2**

(22) Date de dépôt: **20.03.2001**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorité: **22.03.2000 FR 0003669**

(71) Demandeur: **Medicaler
59310 Orchies (FR)**

(72) Inventeur: **Hermant, Olivier
59370 Haubourdin (FR)**

(74) Mandataire: **Hennion, Jean-Claude et al
Cabinet Beau de Loménie,
27bis, rue du Vieux Faubourg
59800 Lille (FR)**

(54) **Procédé d'extraction par un solvant de composés actifs de la chicorée**

(57) La présente invention concerne un procédé d'extraction par un solvant de composés actifs de la chicorée. Selon l'invention, de manière caractéristique,

- on fait macérer de la chicorée dans ledit solvant, à une température basse, de préférence comprise entre 0°C et 6°C, pendant une durée d'au moins douze heures ; et
- on filtre le jus de macération avec un seuil de cou-

pure d'au moins 0,22 µm.

La présente invention concerne également l'utilisation pour la préparation d'une composition destinée à l'hygiène buccale et pour la préparation de produits cosmétiques de l'extrait obtenu par le procédé de l'invention.

EP 1 136 074 A1

Description

[0001] La présente invention concerne un procédé d'extraction par un solvant de composés actifs de la racine de chicorée et notamment de la chicorée torréfiée. La présente invention concerne également l'extrait obtenu par ce procédé et qui présente des propriétés particulièrement intéressantes notamment dans le domaine de l'hygiène buccale. La présente invention concerne encore un dentifrice et un bain de bouche contenant l'extrait de l'invention.

[0002] La racine de la chicorée sauvage ou à café encore appelée *Cichorium Intybus* Linn (abrégé dans la suite du présent texte en C.I.L.) est utilisée depuis l'Antiquité dans le domaine alimentaire et pour ses propriétés médicinales.

[0003] Dans le domaine alimentaire, la racine de la chicorée est souvent utilisée après torréfaction. En revanche, dans le domaine pharmaceutique, ce sont des racines séchées à l'air chaud qui sont presque exclusivement utilisées.

[0004] En 1983, Patel et Venkatakrishna ont montré les propriétés de l'extrait de racine de chicorée torréfiée pour la prévention de la plaque dentaire et le traitement des gingivites. L'extrait utilisé par ces auteurs est obtenu par extraction à chaud à partir de poudre brute de racine de chicorée séchée et torréfiée en présence d'eau ou d'éthanol dans un extracteur de Soxhlet.

[0005] L'extrait ainsi obtenu se présente sous la forme d'un liquide visqueux de couleur noire. Cet extrait de chicorée utilisé en massage permet de diminuer dans une large mesure l'inflammation gingivale, présente des propriétés antimicrobiennes et s'avère être un inhibiteur efficace de la plaque dentaire.

[0006] La présente invention propose un procédé d'extraction par un solvant de composés actifs de la chicorée différent de celui précédemment décrit.

[0007] Selon le procédé d'extraction par un solvant de l'invention, de manière caractéristique, on fait macérer de la chicorée dans un solvant, à une température comprise entre 0°C et 6°C, pendant une durée supérieure ou égale à 12 heures et l'on filtre le jus de macération avec un seuil de coupure d'une valeur au moins égale à 0,22 µm.

[0008] La filtration à un tel seuil de coupure permet d'obtenir à partir d'un jus de macération de chicorée quelconque, un extrait limpide et actif ce qui n'est pas évident du fait que les composés actifs de la chicorée ne sont pas identifiés à ce jour. Cependant, il n'est pas exclu, notamment si la limpidité n'est pas rédhibitoire de réaliser la filtration avec un seuil de coupure plus élevé ou de réaliser la séparation de l'extrait et des résidus solides par d'autres techniques de séparation.

[0009] Il est également possible selon l'invention, en fonction de la quantité de matières solides extraites, de procéder à une ou plusieurs étapes de séparation solide-liquide, éventuellement par filtration, avant de mettre en oeuvre l'étape de filtration du jus de macération avec un seuil de coupure d'une valeur au moins égale à 0,22 µm.

[0010] Sachant que la solubilité des composés contenus dans la chicorée, par exemple l'inuline, (et leurs coefficients de diffusion) augmente avec la température, il est donc tout à fait surprenant qu'il soit possible d'extraire des composés actifs de la racine de chicorée aux températures prévues par le procédé de l'invention. Les températures basses du procédé d'extraction de l'invention permettent de plus une bonne conservation de l'extrait obtenu, sans ajout de conservateur puisqu'aux températures d'extraction du procédé de l'invention, les bactéries se développent peu. De plus, le procédé de l'invention évite toute dégradation thermique de la chicorée qui pourrait éventuellement dénaturer les composés actifs.

[0011] De même, la Demanderesse a également mis en évidence qu'une filtration jusqu'à un seuil de coupure égal à 0,22 µm permet d'obtenir un extrait, comprenant tous les composés actifs, d'une couleur et d'une limpidité optimale pour son utilisation ultérieure.

[0012] Selon l'invention, la quantité de chicorée torréfiée utilisée est telle que le mélange solvant plus chicorée avant macération contient au moins 5% et de préférence 7,4% de matière sèche. De telles quantités permettent en effet d'obtenir des extraits présentant ou susceptibles de présenter les propriétés pharmacologiques (efficacité antimicrobienne et anti-inflammatoire) et physiques (trouble, pourcentage de matière sèche, couleur) optimales pour leur utilisation ultérieure.

[0013] La chicorée utilisée dans le cadre de la présente invention n'est pas limitée à une catégorie spécifique de chicorée. Il peut s'agir, par exemple, de chicorée séchée, torréfiée ou même de la chicorée soluble disponible dans le commerce. De préférence, dans le cas de la chicorée torréfiée, celle-ci est obtenue à l'issue d'une torréfaction dont la température finale n'excède pas 170°C. De plus hautes températures de torréfaction causent en effet des changements indésirables tels qu'une baisse de la fraction extractible et du pH ainsi qu'un goût faible et piquant.

[0014] Selon l'invention, la chicorée torréfiée peut se présenter sous la forme de grains, de grains moulus, de poudre, de liquide ou de pâte. Néanmoins, pour optimiser la quantité de composés actifs qu'il est possible d'extraire selon le procédé de l'invention, il est préférable d'utiliser de la chicorée en poudre en sorte de maximiser la surface de contact entre la chicorée et le solvant.

[0015] On peut obtenir une limpidité de l'extrait suffisante si l'on effectue une filtration du jus de macération avec un seuil de coupure inférieur ou égal à 10 µm.

[0016] Le solvant utilisé selon le procédé de l'invention n'est pas limité. Il peut s'agir de solvants protiques comme, par exemple, l'eau ou les alcools. De préférence, on utilise l'eau à la fois pour des questions de coût et d'innocuité ce

qui s'avère intéressant pour les utilisations ultérieures de l'extrait obtenu selon le procédé de l'invention.

[0017] L'extrait obtenu selon le procédé de la présente invention peut notamment être utilisé pour la préparation d'une composition destinée à l'hygiène buccale. Il peut également être utilisé pour la préparation d'une composition cosmétique. En effet, l'extrait obtenu par le procédé de l'invention présente toutes les propriétés connues de l'extrait de chicorée obtenu par extraction à chaud, à savoir des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires sans en présenter la couleur noire qui en limite l'utilisation.

[0018] De préférence, le bain de bouche de l'invention contient une quantité comprise entre 8% et 12% et de préférence égale ou sensiblement égale à 10% en masse de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'invention.

[0019] De même, le dentifrice de l'invention contient une quantité comprise entre 8% et 12% et de préférence égale ou sensiblement égale à 10% en masse de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'invention.

[0020] La présente invention sera mieux comprise et ses caractéristiques et avantages apparaîtront mieux à la lecture de la description et des exemples de mise en oeuvre qui suivent.

Exemple de préparation d'un premier extrait de chicorée de l'invention

[0021] La chicorée torréfiée utilisée dans cet exemple présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

couleur	50 à 70 (color test Neuhaus)
matière sèche mesurée à 70°C	> 95%
granulométrie moyenne	90% < 0,710 mm
pH en solution aqueuse à 10%	compris entre 4,0 et 4,5

et les caractéristiques bactériologiques suivantes :

germes aérobies mésophiles < 10/g
levures : 0/ g
moisissures : 0 / g

[0022] 100g de la chicorée en poudre définie ci-dessus ont été mélangés dans un réacteur calorifugé à de l'eau osmosée refroidie à 4°C. Le mélange est mis sous faible agitation pendant environ une minute afin de l'homogénéiser. La quantité d'eau utilisée est telle que la matière sèche du mélange eau + chicorée représente 7,4% en masse du mélange. Le mélange est maintenu à 4°C pendant 24 heures sans agitation. On effectue ensuite une première filtration en sorte d'éliminer les matières en suspension. Cette filtration est par exemple mise en oeuvre au moyen d'une toile de filtre presse présentant un seuil de coupure de 10-20µm. Cette première filtration peut également être mise en oeuvre par centrifugation ou par toute autre technique connue de séparation solide-liquide. Après cette première filtration on obtient un marc solide qui représente environ 18% en volume du mélange initial et dont le pourcentage de matière sèche est de 16,5%. Le jus de macération également obtenu représente 82% en volume du mélange initial et présente un taux de matière sèche de l'ordre de 6%. Ce jus de macération est dilué avec de l'eau osmosée afin de le ramener au volume initial d'eau mélangé à la chicorée. Après cette dilution, le taux de matière sèche du jus de macération se situe aux alentours de 4,5%.

[0023] On effectue alors une seconde filtration qui a principalement pour but d'obtenir un jus de macération limpide. Pour ce faire on utilise des plaques de cellulose du type K900, K300 ou S80 qui présentent un seuil de coupure moyen compris respectivement entre 8 et 10µm, 4µm et 6 µm. et 0,22µm. Toute autre technique analogue, comme la filtration membranaire peut également être utilisée. Le filtrat obtenu correspond à l'extrait de composés actifs de chicorée de la présente invention.

[0024] Cet extrait présente les caractéristiques suivantes :

matière sèche totale	4 à 5%
pH	4 à 4,5
cendres/matière sèche	4,4 à 5,6%
protéines/matière sèche	3,1 à 4,1%
coloration (mesurée à 420 nm)	1,500 à 1,700
trouble (mesuré à 600 nm)	0,100 à 0,140
glucose/matière sèche	7,5 à 9,5%
fructose/matière sèche	7,0 à 9,0 %
DP2/matière sèche	14,0 à 16,0 %

(suite)

inuline / matière sèche	6 à 9%
-------------------------	--------

[0025] Dans le cas d'un extrait obtenu après centrifugation pour la séparation solide-liquide et filtration avec un seuil de coupure de 0,22µm, on obtient une valeur moyenne globale de la coloration mesurée à 420 nm comprise entre 0,800 et 1,700 et une valeur moyenne du trouble mesurée à 600 nm comprise entre 0,085 et 0,140.

[0026] Le fait de mettre en oeuvre l'étape de macération sans agitation permet d'influencer le bilan matière et la répartition liquide/solide. La Demanderesse a en effet noté que la teneur en inuline de l'extrait obtenu est plus faible sans agitation (inférieure à 37%) alors que la teneur en sucres libres de l'extrait est indépendante de l'agitation. Les résultats concernant l'influence de l'agitation sont regroupés dans les tableaux I à III annexés à la présente description.

[0027] L'activité antimicrobienne de l'extrait de l'invention a également été testée.

Etude in vitro de l'activité antibactérienne d'un second exemple d'extrait de l'invention

[0028] 200 g de C.I.L. sous forme séchée sont mécaniquement réduits en poudre et partagés en deux lots de 100 grammes chacun. Un premier lot dit CIC/SEC/ED est repris par 400 ml d'eau distillée soumis à agitation magnétique en chambre froide à 4°C pendant une nuit. Le mélange ayant beaucoup gonflé, 400 ml d'eau distillée sont rajoutés et l'extraction aqueuse est reprise. Après 24 heures, le mélange est filtré et le matériel retenu est abondamment lavé.

[0029] Un deuxième lot dit CIC/SEC/ALC est repris par 400 ml d'éthanol absolu (99%) est soumis à agitation magnétique en chambre froide à 4°C pendant une nuit. Le mélange est alors filtré et le matériel retenu est abondamment lavé à l'éthanol pur. Le filtrat alcoolisé est évaporé au rotavapeur Buchi sous vide à 50°C. Le résidu pâteux est repris par 30 ml d'eau distillée et mis en dialyse contre de l'eau distillée : la dialyse est poursuivie pendant quatre jours en renouvelant l'eau distillée de dialyse chaque jour. L'extrait est alors conservé en congélation à -34°C. Deux autres lots appelés respectivement CIC/GRI/ED et CIC/GRI/ALC ont été préparés conformément à ce qui précède à partir de chicorée grillée, c'est-à-dire torréfiée.

[0030] Chacun des extraits secs congelés en coquille est soumis à lyophilisation. La lyophilisation s'est avérée longue mais aucune décongélation précoce ou intempestive des échantillons n'a été observée.

[0031] A l'issue de la lyophilisation, les quantités de matière sèche ont été mesurées.

	CIC/SEC/ED	CIC/GRI/ED	CIC/SEC/ALC	CIC/GRI/ALC
POIDS (g)	7,96	14,36	0,4462	0,6742
POIDS SEC DE L'EXTRAIT/200 G DE MATIERE PREMIERE (%)	3,98 %	7,18 %	0,22 %	0,33%

[0032] Les extraits aqueux (CIC/SEC/ED et CIC/GRI/ED) sont repris par 100 ml d'eau distillée tandis que les extraits alcoolisés sont repris par 10 ml d'eau distillée. Une solution de chicorée soluble du commerce a également été préparée à raison de 10 g pour 100 ml de milieu de culture TGY. Le milieu TGY est ainsi défini :

- trypticase : 30 g
- extrait de levure : 10 g
- glucose : 27 mM
- tampon Tris : 100 mM
- acide chlorhydrique qsp : pH 7,5
- eau bi-distillée qsp : 1000 ml

[0033] Le milieu ainsi formé est réparti dans des tubes de 25 ml et stérilisé en autoclave.

[0034] Ce milieu TGY sert à la culture de *Streptococcus mutans* IM 2201 et *Bacterionoma matruchotii* IM 2219 issus tous deux de la collection de l'Institut Mérieux. Les cultures introduites dans le milieu TGY sont incubées à 37° C pendant 24 heures.

[0035] Par ailleurs, de la plaque dentaire humaine fraîchement récupérée sur patient fut également mise en culture dans le milieu liquide « cerveau-cœur ». Après 24 h de développement, cet isolat de plaque est repiqué sur le milieu décrit plus haut.

[0036] De même, *Prevotella intermedia* AIP N 161/79 (ex *Bacteroides intermedius*) et *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 issus de la collection de l'institut Pasteur de Paris et de la collection américaine sont cultivés dans des conditions anaérobies pendant 24 heures et 48 heures à 37°C dans un milieu liquide ayant la composition suivante :

- trypticase : 30g
- extrait de levure : 20g
- cysteine : 0,5g
- hémine : 5 mg
- glucose: 180mM
- eau distillée qsp : 1000ml

[0037] Des milieux de culture test ont été préparés. Des tubes TGY de 25 ml reçoivent respectivement 0, 5 ml d'extrait chicorée séchée aqueux (CIC/SEC/D = 0,15 % p/v), 0,5 ml d'extrait chicorée torréfié aqueux (CIC/GRI/ED = 0,28 % p/v), 1ml de solution de chicorée du commerce (= 0,4 % p/v), 0,5 ml d'extrait chicorée torréfié alcoolique (CIC/GRI/ALC = 0,09 % p/v) et 0,5 ml d'extrait chicorée séchée alcoolisée (CIC/SEC/ALC = 0,13 % p/v). Chaque tube de culture supplémenté en extrait aqueux contient un équivalent de 1g C.I.L. et de 10 g pour l'extrait alcoolique. Tous ces tubes sont introduits dans un autoclave pendant 30 minutes et conservés à 4°C. Il est à noter que ces concentrations sont compatibles avec les conditions d'utilisation de la chicorée en alimentation humaine.

[0038] A chacun des milieux tests précédemment décrits auxquels sont ajoutés des tubes témoins dépourvus de toute trace de chicorée sous quelque forme que ce soit, est incorporé dans des conditions stériles, 1 ml de milieu de culture âgé de 24 h, soit de *Streptococcus mutans* soit d'isolat de plaque bactérienne dentaire humaine.

[0039] Les études statistiques montrent l'activité de l'extrait de chicorée. Pour des temps s'échelonnant de 0 à 21 h, des prises de 3 ml sont effectuées dans chaque tube après agitation vortex. Chaque prise est soumise à centrifugation 500 x g pendant 5 mn à 4°C (ces conditions respectent l'intégrité des corps bactériens). Les surnageants sont soigneusement éliminés et à chaque culot sont ajoutés 2 ml d'eau distillée. Le tout est alors soumis à agitation vortex afin de redisperser les cellules bactériennes dans la phase aqueuse. La turbidité qui reflète la croissance bactérienne pour une culture donnée est mesurée pour chaque échantillon dans un spectrophotomètre Beckman DU5 (dispositif d'aspiration à la température réglée à 610 nm de longueur d'ondes).

[0040] Il ressort de ces expérimentations que les extraits de C.I.L. de l'invention perturbent la croissance bactérienne pendant la phase logarithmique. Pour *Streptococcus mutans* IM 2209, l'effet le plus sensible se manifeste dans les premières heures de la croissance.

[0041] C'est la culture de *Bacterionema matruchotii* IM 2219 qui semble être la plus sensible aux extraits de C.I.L. de l'invention. L'effet inhibiteur est surtout manifeste dans la deuxième phase de croissance entre 28 et 48 heures avec toutes les formes de C.I.L. (séché aqueux, torréfié aqueux, séché alcoolique, torréfié alcoolique et chicorée du commerce).

[0042] La Demanderesse a également mis en évidence ce même effet inhibiteur sur la plaque bactérienne dentaire humaine mise en culture avec un ralentissement de la croissance globale manifeste dès la onzième heure, plus prononcé avec l'extrait aqueux de chicorée grillée. Les germes anaérobies testés sont eux aussi sensibles aux extraits de C.I.L. de l'invention.

[0043] Avec *Prevotella Intermedia*, cet effet est plus marqué avec les extraits aqueux mais reste significatif avec toutes les formes utilisées y compris avec la chicorée commerciale. En ce qui concerne *Porphyromonas gingivalis*, sa croissance est affectée à hauteur d'environ 10 à 20 %.

[0044] Il est à noter que les concentrations des extraits de C.I.L. de l'invention utilisés ici sont comparables aux taux habituellement consommés en alimentation humaine, soit pour une solution de milieu de culture de 25 ml, l'équivalent de 1 g de matière première (extrait aqueux) ou 10 g (extrait alcoolique).

[0045] En conclusion, l'extrait de C.I.L. de la présente invention réduit in vitro la croissance des espèces bactériennes les plus représentatives de la flore buccale. Leur croissance est ralentie en moyenne de 10 à 50 % selon les espèces, la nature des extraits et les temps de culture sur milieu liquide.

Etude in vivo de l'activité antibactérienne du premier exemple d'extrait de l'invention

[0046] L'extrait de l'invention utilisé pour cette étude est obtenu après macération à 4°C pendant 24 heures sans agitation d'un mélange de chicorée torréfiée dans de l'eau osmosée (contenant 7,4 % en masse de matière sèche) et filtration du jus de macération ainsi obtenu avec un seuil de coupure compris entre 4µm et 10µm. La concentration en chicorée de cet extrait est telle qu'il contient environ 4,5 % en masse de matière sèche.

[0047] Cet extrait a été utilisé pour la préparation d'un bain de bouche et d'une pâte dentifrice qui contiennent chacun environ 10% en masse de cet extrait.

[0048] La pâte gingivale et le bain de bouche ainsi obtenus ont été comparés à une pâte gingivale à base de Sanguinarine, un bain de bouche à la chlorhexidine et deux placebos (bain de bouche et pâte gingivale).

[0049] La chlorhexidine est un composé communément employé actuellement en parodontologie ; c'est un antiseptique efficace utilisé dans de nombreux domaines de la médecine en raison de sa faible toxicité et de son large spectre antibactérien.

[0050] La sanguinarine est un antiseptique obtenu par extraction alcoolique à partir de la plante *Sanguinaria canadensis* originaire du nord Canada. On a noté in vivo une activité de la sanguinarine sur l'inflammation gingivale. Son utilisation est fréquemment suggérée en phase de maintenance du traitement parodontal en complément des mesures d'hygiène orale.

[0051] L'étude suivante a été menée sur 45 jours pour chaque patient sur une période s'étendant de septembre 1998 à octobre 1999 et a concerné 120 patients répondant aux critères d'inclusion. A chaque patient était attribué un dossier numéroté. Les patients étaient âgés de 35 à 65 ans et présentaient une parodontite d'adulte selon les critères de l'American Academy of Parodontology et au moins une poche parodontale supérieure à 3 mm confirmée par l'examen radiographique et clinique (critères d'inclusion)

[0052] Les patients ont été séparés arbitrairement en six groupes :

- chicorée bain de bouche,
- chicorée bain de bouche placebo,
- chicorée pâte gingivale,
- chicorée pâte gingivale placebo,
- pâte gingivale à la sanguinarine (PERIOGARD®), bain de bouche à la chlorhexidine à 0,12 % (PAROEX®).

[0053] Chaque groupe comprend 20 patients.

Au jour « J0 » de l'expérimentation, un détartrage supra gingival est effectué pour placer les patients dans des conditions d'hygiène initiale proche. Trois indices ont été relevés lors de l'étude sur six dents (16, 12, 24, 36, 32, 44):

- indices de plaque (Silness et Loe 1964) -,
- indice gingival (Loe et Silness 1963 - GI -),
- indice de saignement (Mühlemann - HR - modifié en 1981).

[0054] Pour le groupe chicorée bain de bouche, la diminution des indices est observable entre J15 et J45 pour les indices de plaque, gingivale et les saignements. L'évolution des indices de J 15 à J 45 est de 0,93 à 0,53 (indice de plaque), 1,01 à 0,52 (indice gingival), 1,04 à 0,51 (indice de saignement). Ces diminutions semblent d'une amplitude comparable à celle obtenue avec le bain de bouche PAROEX®.

[0055] Pour le groupe utilisant un bain de bouche PAROEX®, les indices évoluent tous favorablement confirmant l'efficacité déjà prouvée de la chlorhexidine sur les paramètres cliniques de l'inflammation et la réduction de l'accumulation de la plaque bactérienne. L'évolution des indices de J 15 à J 45 est de 0,87 à 0,45 (indice de plaque), 0,96 à 0,58 (indice gingival), 0,97 à 0,62 (indice de saignement).

[0056] Concernant le groupe placebo bain de bouche, l'évolution des indices de J 15 à J 45 est de 0,69 à 0,60 (indice de plaque), 0,79 à 0,66 (indice gingival), 0,97 à 0,71 (indice de saignement). Le produit ne semble pas modifier de façon significative l'indice de plaque, a peu d'action sur l'indice gingival malgré l'effet du brossage et a réduit l'indice de saignement. L'étude statistique précisera si ces variations sont significatives.

[0057] Pour le groupe chicorée pâte gingivale, il a été observé une baisse globale sur les trois indices cliniques. L'évolution des indices de J 15 à J 45 est de 0,84 à 0,48 (indice de plaque), 0,90 à 0,46 (indice gingival) , 0,97 à 0,51 (indice de saignement).

[0058] Pour le groupe PERIOGARD®, l'évolution des indices J 15 à J 45 est de 0,60 à 0,49 (indice de plaque), 0,65 à 0,61 (indice gingival), 0,83 à 0,68 (indice de saignement).

[0059] Concernant le groupe placebo pâte gingivale, l'évolution des indices de J 15 à J 45 est de 0,80 à 0,81 (indice de plaque), 0,85 à 0,73 (indice gingival), 0,81 à 0,90 (indice de saignement). Les indices observés présentent des modifications faibles ou nulles entre J 15 et J 45 en fin d'étude. L'indice de saignement présente une augmentation sensible montrant qu'il s'agit bien d'un groupe placebo.

[0060] Les études statistiques effectuées (test de Student) montrent que les différences observées sont pour tous les indices significatives, très significatives, voire hautement significatives au jour J 45 dans le groupe « chicorée bain de bouche » et le groupe « chicorée pâte gingivale ». De même, les variations observées entre J 15 et J 45 sont comparables, voire supérieures (pâte gingivale) à celles observées avec les produits actifs utilisés en groupe contrôle.

[0061] Il est à noter que l'extrait de l'invention utilisé pour la préparation du bain de bouche et de la pâte dentifrice ci-dessus décrits présente une saveur et une couleur telles que notamment dans la proportion précédemment indiquée (10%), la pâte dentifrice et le bain de bouche obtenus ont tous une coloration beige pâle acceptable par le consommateur et un goût peu prononcé qualifié comme non gênant voire d'agréable par les patients utilisateurs. L'utilisation de l'extrait obtenu à chaud ne permet d'obtenir de tels résultats.

[0062] Par ailleurs, aucune coloration des dents ni des muqueuses jugales, labiales et gingivales des utilisateurs n'a été notée.

[0063] L'activité anti-inflammatoire de l'extrait de l'invention a également été testée in vitro.

Etude in vitro de l'activité anti-inflammatoire d'un exemple d'extrait de l'invention

[0064] L'extrait utilisé pour cette étude correspond à l'extrait de l'invention obtenu dans l'exemple de préparation d'un premier extrait de chicorée décrit précédemment. Le but principal de l'essai est d'étudier les mécanismes d'action de la chicorée sur l'inflammation et l'effet sur la sécrétion d'interleukine 1 alpha (IL-1 α) marqueur précoce de l'inflammation.

[0065] Le modèle in vitro utilisé sont des cultures de kératocytes gingivaux humains normaux. L'IL-1 α a été mesurée dans les milieux d'incubation des kératocytes par dosage ELISA. Les effets de l'extrait de chicorée de l'invention ont été comparés à ceux observés en présence de dexaméthasone, utilisée comme produit de référence. L'extrait de chicorée testé dans des concentrations de 0,01 et 0,4% (P/V) montrait après 24 heures d'incubation, un effet qui peut être qualifié d'anti-inflammatoire dans des kératocytes gingivaux humains en culture. Les effets observés sont comparables voire supérieurs à ceux obtenus en présence de la dexaméthasone, produit anti-inflammatoire pharmacologique de référence.

[0066] Par ailleurs, La Demanderesse a confirmé que l'IL-1 α augmentait la protéolyse de la matrice extra cellulaire des fibroblastes gingivaux humains en culture. Ainsi, l'extrait de chicorée de l'invention qui diminue la libération d'IL-1 α à partir des cellules supérieures de la muqueuse buccale (les kératocytes), peut prétendre exercer une protection anti-protéolyse de la matrice extra cellulaire de la gencive en réponse à une réaction inflammatoire.

Tableau I

RESULTATS ANALYTIQUES : EXTRACTION DE 5 ECHANTILLONS DE CHICOREE MOULUE

L'extraction a lieu pendant 24 heures à une température de 4°C sans agitation

	PH	MST	Cend./sec	P/sec	Abs 420nm	Abs 600nm	Glucose ^g / sec	Fructose %/sec	DP2 %/sec	inuline %/sec
99L059-7	4.13	4.12	5.0	4.1	1.563	0.116	7.6	8.7	14.9	8.6
99L240-7	4.03	4.08	5.10	4.1	1.707	0.118	8.7	7.8	16.0	3.5
2001 L089-9	4.29	4.41	4.71	4.1	1.594	0.124	8.2	7.9	15.3	8.4
2001 L263-9	4.23	4.53	5.23	3.1	1.710	0.133	7.7	8.0	14.6	7.5
2001 L309-9	4.22	4.39	5.6	3.2	1.632	0.125	7.8	7.0	14.9	8.2
moyenne	4.18	4.31	5.12	3.7	1.641	0.123	8.0	7.88	15.2	7.24
C.V	2.41%	4.54%	6.34%	13.27%	4.02%	4.9%	5.65%	7.7%	3.55%	29.4%

REMARQUE :

- Les valeurs de pH ont été lues à la matière sèche du produit
- La coloration et la limpidité ont été effectuées à 0.25% par rapport à la matière sèche.
- Les cendres ont été effectuées à 550°C.
- L'inuline a été dosée après hydrolyse du jus par une inulinase à pH4.5 pendant 30minutes.

Tableau II

RESULTATS ANALYTIQUES : EXTRACTION DE 5 ECHANTILLONS DE CHICOREE MOULUE

. L'extraction a lieu pendant 24 heures à une température de 4°C avec une **agitation forte**.

	PH	MST	Cendres/sec	P/sec	Abs 420nm	Abs 600nm	Glucose%/sec	Fructose %/sec	DP2 %/sec	inuline %/sec
99L059 7	4.29	5.88	5.27	4.5	1.853	0.222	8.2	8.96	12.4	12.3
99L240 7	3.98	5.7	5.52	3.6	2.030	0.226	7.9	8.4	13.77	8.9
2001L089 9	4.28	6.09	5.04	3.8	1.696	0.196	7.10	7.55	12.7	12.7
2001L263 9	4.44	6.23	4.97	3.7	1.787	0.208	8.2	8.2	12.7	11.2
2001L309 9	4.16	5.98	4.97	2.8	1.538	0.174	7.7	9.6	13.5	11.6
Moyenne	4.23	5.97	5.15	3.7	1.7808	0.205	7.9	8.6	13.01	11.34
C.V	4.01%	3.35%	4.46%	16.3%	10.22%	10.24%	5.8%	9.1%	4.5%	13.05%

Remarque :

- Les valeurs de pH ont été lues à la matière sèche du produit
- La coloration et la limpidité ont été effectuées à 0.25% par rapport à la matière sèche.
- Les cendres ont été effectuées à 550°C.
- L'inuline a été dosée après hydrolyse du jus par une inulinase à pH4.5 pendant 30minutes.

Tableau III

RESULTATS ANALYTIQUES : EXTRACTION DE LA CHICOREE MOULUE AU LABORATOIRE.

Etude de différentes membranes de filtration

- Membrane K900 : seuil de coupure de 8-10 μm
- Membrane K300 : seuil de coupure de 4-6 μm
- Membrane S80 : seuil de coupure de 0.22 μm

	PH	MST	Cend/sec	P/sec	Abs420 nm	Abs 600nm	Glucose %/sec	Fructose %/sec	DP2 %/sec	Inuline %/sec
K900	3.91	5.09	4.22	4.03	1.667	0.169	8.6	8.5	14.8	5.5
K300	4.12	5.09	4.44	3.92	1.597	0.139	9.3	8.95	15.5	6.3
S80	5.21	3.52	5.42	3.4	0.806	0.085	9.1	8.2	16.3	5.0

Revendications

1. Procédé d'extraction par un solvant de composés actifs de la chicorée, **caractérisé en ce que** :

- on fait macérer de la chicorée dans ledit solvant, à une température basse, de préférence comprise entre 0°C et 6°C, pendant une durée d'au moins douze heures ; et
- on filtre le jus de macération avec un seuil de coupure d'une valeur au moins égale à 0,22 µm.

2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la quantité de chicorée utilisée est telle que le mélange solvant plus chicorée contient au moins 5% et de préférence 7,4% de matière sèche.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce que** l'on effectue préalablement à la filtration avec un seuil de coupure d'au moins 0,22µm une première filtration avec un seuil de coupure compris entre 10µm et 20µm.

4. Procédé selon la revendication 3, **caractérisé en ce qu'**après ladite première filtration on dilue le filtrat en sorte que la matière sèche dudit filtrat soit sensiblement égale ou égale à 4,5%.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce que** ladite chicorée est torréfiée avant macération.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce que** ladite chicorée est sous forme de poudre et en ce que l'on réalise un mélange homogène de la chicorée et dudit solvant, sous faible agitation.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en que la phase de macération est mise en oeuvre sans agitation.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que** l'on filtre le jus de macération avec un seuil de coupure inférieur ou égal à 10µm.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, **caractérisé en ce que** ledit solvant utilisé est l'eau.

10. Procédé selon la revendication 9, **caractérisé en ce que** l'on fait macérer ladite chicorée à une température sensiblement égale ou égale à 4°C.

11. Procédé selon la revendication 10, **caractérisé en ce que** l'on fait macérer ladite chicorée pendant une durée sensiblement égale ou égale à 24 heures.

12. Utilisation de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la préparation d'une composition destinée à l'hygiène buccale.

13. Utilisation de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la préparation d'une composition cosmétique.

14. Bain de bouche contenant une quantité comprise entre 8% et 12% et de préférence égale ou sensiblement égale à 10% en masse de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'une quelconque des revendications 2 à 11.

15. Dentifrice contenant une quantité comprise entre 8% et 12% et de préférence égale ou sensiblement égale à 10% en masse de l'extrait de chicorée obtenu selon le procédé de l'une quelconque des revendications 2 à 11.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 01 49 0011

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
X	DATABASE FSTA 'en ligne! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE; MI-JUNG HONG ET AL: "Changes in browning characteristics of chicory roots by roasting processes." Database accession no. 1999-00-h0565 XP002156081 * abrégé * & JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION 27 (4) 591-595 1998 CORRESPONDENCE (REPRINT) ADDRESS, JOONG-HO KWON, DEP. OF FOOD SCI. & TECH., KYUNGPOOK NAT. UNIV., TAEJU 702-701, KOREA, ----	1	A61K35/78 A61K7/26 A61P1/00
A	EP 0 126 513 A (SUIKER UNIE) 28 novembre 1984 (1984-11-28) -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7) A61K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 6 août 2001	Examineur Rempp, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 03/92 (P04002)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 01 49 0011

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

06-08-2001

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0126513 A	28-11-1984	NL 8301787 A	17-12-1984
		AT 24021 T	15-12-1986
		CS 8403699 A	16-12-1985
		DE 3461547 D	15-01-1987
		JP 1391294 C	23-07-1987
		JP 59224700 A	17-12-1984
		JP 61047520 B	20-10-1986
		US 4702839 A	27-10-1987

EPO FORM P0480

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82